

## Impacto da quantidade de água na cor de uma antocianidina (Luteolinidina)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Elaborado por: Manuella Brito Tavares  
Orientador: Doutor João Carlos Lima  
Co-orientador: Doutor Artur Moro

Monte da Caparica  
2014-2015

A faculdade de ciências e tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa, tem o poder de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares independentemente da forma de divulgação. Venho por este meio dar a liberdade de distribuição com o objetivo educacionais, ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado a consideração ao autor e editor.

Manuella Brito Tavares



## Conteúdo

1. Agradecimentos.....	4
2. Resumo.....	11
3. Abstract.....	12
4. Introdução.....	13
4.1. Aspetos Gerais .....	13
4.2. Antocianinas .....	15
4.3. Impacto do meio e da concentração na cor .....	21
4.4. Água/ Liofilização .....	22
5. Parte experimental .....	23
6.Resultado e Discussão .....	25
6.1. Comportamento da luteolinidina em água .....	25
6.2. Determinação das constantes de equilíbrio do sistema.....	26
6.3. Comportamento da luteolinidina na presença de aditivos .....	31
7. Conclusão.....	34
8. Anexo .....	35
9.Bibliografia.....	43



## 1. Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles que me apoiaram e que tornaram possível a realização da minha dissertação de mestrado.

Quero agradecer ao professor Doutor João Carlos Lima, pela oportunidade, apoio, pelo conhecimento que fez com que os meus neurónios se conectassem mais rapidamente para acompanhar cada palavra e pela sua paciência. Professor obrigada pela compreensão e por me ter deixado ficar algumas vezes sozinha no seu laboratório, obrigada pela confiança.

Ao Doutor Artur Moro, pela sua preciosa orientação, pelo seu empenho e pela sua disponibilidade em me ajudar.

Queria agradecer a minha mãe e irmã por toda a ajuda e paciência.

Por fim quero agradecer ao Joel Cruz, pela sua ajuda, pelo seu amor, compreensão e por acreditar em mim mais do que eu própria acredito. Sem ele tudo seria muito mais difícil.

A todos simplesmente muito obrigada.



## Símbolos e notações

AH <sup>+</sup>	Catião flavílio
A	Base quinoidal
B	Hemiacetal
Cc	Chalcona <i>cis</i>
Ct	Chalcona <i>trans</i>
K <sub>a</sub>	Constante de equilíbrio da reação de desprotonação do catião flavílio a base quinoidal
K <sub>h</sub>	Constante de equilíbrio da reação de hidratação do catião flavílio a hemiacetal
K <sub>t</sub>	Constante de equilíbrio da reação de tautomerização do hemiacetal a chalcona <i>cis</i>
K <sub>i</sub>	Constante de equilíbrio da reação de isomerização da chalcona <i>cis</i> a chalcona <i>trans</i>
K' <sub>a</sub>	Constante de equilíbrio aparente entre o catião flavílio e todas as outras espécies
Abs	Absorvância
C <sub>0</sub>	Concentração total de todas as espécies envolvidas
U.V.-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
X <sub>AH<sup>+</sup></sub>	Fração molar do catião flavílio
X <sub>A</sub>	Fração molar da base quinoidal
X <sub>B</sub>	Fração molar do hemiacetal
X <sub>Cc</sub>	Fração molar da chalcona <i>cis</i>
X <sub>Ct</sub>	Fração molar da chalcona <i>trans</i>



## Índice de esquemas

Esquema1- Modificações estruturais das antocianinas em solução aquosa.....	18
--	----



## Índice de tabelas

Tabela1: Grupos de flavonóides, com componentes e fontes alimentares respetivamente...15

Tabela2: Identificação estrutural das antocianidinas, efeito da substituição "R" .....17

Tabela3: Valores das constantes termodinâmicas para o sistema de luteolinidina com diferentes quantidades de água, metanol e acetato..... 33



## Índice de figuras

Figura1: Estrutura simples de um flavonóide, neste caso uma antocianidina.....	14
Figura 2:Estrutura química dos principais tipos de flavonóides.....	14
Figura 3: (A) Espectro de absorção de luteolinidina imediatamente após o salto de pH. (B) Espectro de absorção da solução de luteolinidina após dois dias no escuro.....	19
Figura 4: (I) espectro de absorção de espécies a partir da luteolinidina em água/metanol (3:1) a 25°C, (-) AH <sup>+</sup> , (....) A e (---) Ct. (II) fração molar em função.....	20
Figura 5: Variação dos espectros de absorção da luteolinidina em água adquirido (I) de imediato e (II) após 32 dias, a diferentes pH.....	25
Figura 6: Luteolinidina em água. Espetro de absorção experimental e ajuste teórico a 489nm. O ajuste foi obtido para os valores de $K_a=2.5 \times 10^{-4} M$ e $K_h K_t K_i=1.8 \times 10^5 M$ .....	29
Figura 7: Espectros de absorção equilibrados de luteolinidina em misturas de água/metanol 10:90, a diferentes pHs.....	30
Figura 8: Fração molar calculada das espécies envolvidas ( $X_{AH^+}$ , $X_A$ e $X_{Ct}$ ) em água:metanol a diferentes pHs (10:90).....	30
Figura 9: Variação de $K_a$ e $K_h K_t K_i$ em função da percentagem de água.....	31
Figura 10: Espectros de absorção de luteolinidina em solução aquosas de acetato com diferentes quantidades de metanol: (I) 100:0, (II) 10:90.....	32
Figura 11: Variação de $K_a$ e $K_h K_t K_i$ em função da percentagem de água, na presença de acetato.....	32



Figura A1: Comportamento da Luteolinidina em água. (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 32 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 2,50E-04$  e  $K_hK_tK_i = 1,80E-05$ .....35

Figura A2: Comportamento da Luteolinidina em água/metanol (50:50). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 3 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 1,00E-04$  e  $K_hK_tK_i = 4,20E-04$ .....36

Figura A3: Comportamento da Luteolinidina em água/metanol (25:75). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 11 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 3,00E-05$  e  $K_hK_tK_i = 1,00E-03$ .. .....37

Figura A4: Comportamento da Luteolinidina em água/metanol (10:90). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 3 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 5,00E-05$  e  $K_hK_tK_i = 1,50E-03$ .. .....38

Figura A5: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato . (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 2,03E-06$  e  $K_hK_tK_i = 1,10E-03$ ..... 39

Figura A6: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato/metanol (50:50). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 5,31E-04$  e  $K_hK_tK_i = 2,16E-05$ .....40

Figura A7: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato/metanol (25:75). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 1,00E-03$  e  $K_hK_tK_i = 2,64E-05$ .....41

Figura A8: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato/metanol (10:90). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 1,50E-03$  e  $K_hK_tK_i = 9,54E-06$ .....42



## 2. Resumo

A luteolinidina é um corante natural responsável pela cor do sorgo, da família das antocianidinas e antocianinas responsáveis pela cor vermelha de alguns frutos silvestres tais como o morango e a framboesa.

O objetivo principal deste trabalho foi verificar o impacto da remoção de água na cor da luteolinidina usando como modelo misturas de solvente orgânico/água a diferentes pHs, para simular a mudança de polaridade durante a secagem.

Os estudos efetuados por espectroscopia de absorção UV/Visível permitiram a identificação das várias espécies em equilíbrio, nomeadamente catião flavílio ( $AH^+$ ), base quinoidal (A) e chalcona *trans* (Ct), sendo as primeiras ( $AH^+$  e A) responsáveis pela cor. O favorecimento da formação de Ct leva a perda de cor. A quantificação da perda de cor foi feita através do cálculo das constantes de formação de A ( $K_a$ ) e  $C_t$  ( $K_h K_t K_i$ ) nas diversas misturas estudadas.

Os resultados obtidos permitem prever que os alimentos contendo luteolinidina devem sofrer perda de cor durante o processo de secagem, uma vez que a diminuição da percentagem de água nas misturas favorece a formação de  $C_t$ .

Como tal, foi também testado o efeito da adição de acetato de sódio às misturas, como potencial co-pigmento. Verificou-se que o acetato contribui para a manutenção de cor durante o processo de redução de água, favorecendo formação de base quinoidal (A), espécie corada, que é menos sensível às reações que levam à perda de cor (hidratação). Isto abre a perspetiva da utilização de estabilizadores de cor durante a secagem.



### 3. Abstract

Luteolinidin is a natural dye belonging to the family of anthocyanidins, and is responsible for the red/purple color of several plants and fruits, including sorghum, strawberry and raspberry.

The most important aim of this study was to assess the impact of water removal in the color of luteolinidina, by using “organic solvent (methanol)/ water” mixtures at different pHs in order to simulate the change in polarity of the media, suffered during industrial drying processes (e.g. lyophilization).

Changes in color at different conditions were measured through UV/Vis spectroscopy, allowing for the identification of all the species present in equilibrium, namely flavylium cation ( $AH^+$ ), quinoidal base (A) and *trans*-chalcone (Ct), being the first two species ( $AH^+$  and A) responsible for the typical color of luteolinidin. Promoting the formation of Ct leads to a loss of color. Quantification of overall color loss was determined by the equilibrium constants which account for the formation of either A ( $K_a$ ) or Ct ( $K_hK_tK_i$ ), in each of the different conditions (pH and water content).

The obtained results allow for predicting that foods containing luteolinidin suffer a loss of color during the drying process, since reduction of the water percentage in the mixture favors the formation of Ct.

Additionally, effects of the addition of sodium acetate in the same pH and solvent conditions were also measured, as a means to determine its potential as a co-pigment for color stabilization of luteolinidin. Determination of the above mentioned equilibrium constants led us to conclude that sodium acetate contributes for the stabilization of color upon water removal, favouring the formation of the coloured species A, being the latter less sensitive to hydration mechanism that induce color loss. This result opens a new perspective into the use of color stabilizers during industrial drying processes.



## 4. Introdução

### 4.1. Aspetos Gerais

A qualidade dos alimentos é um dos maiores prazeres da vida. A cor desempenha um papel importante na satisfação dos géneros alimentícios, e é fator de relevância significativa na avaliação da qualidade alimentar. Neste último aspeto, a cor dá pistas de como o alimento se encontra em termo de gostos, preferências alimentares e escolhas.

Na indústria de alimentos utilizam-se corantes de origem sintética, pois a ausência da coloração associada a alguns alimentos (por exemplo aos frutos) dificultariam a aceitação dos consumidores em relação ao produto. Sabendo que os corantes sintéticos apresentam menores custos, maior estabilidade e uma maior capacidade tintorial, a indústria alimentar tem investido fortemente nestes compostos. No entanto, o uso deste tipo de aditivos diminui a cada ano por razões de segurança alimentar. De acordo com Hamerski, alguns corantes artificiais são cancerígenos, podendo causar alergia e irritação na pele (Hamerski, et al., 2013).

A procura, por parte do consumidor, de produtos alimentares sem corantes sintéticos leva a que se desenvolvam esforços no sentido de descobertas de novos métodos que promovam simultaneamente a aceitação/preferência do consumidor e a rentabilidade dos produtores. Hoje em dia, existem várias pesquisas a desenvolver sobre corantes naturais, com o objetivo de diminuir ou eliminar o uso de corantes sintéticos no processamento de alimentos (Francis, 1989).

Os corantes naturais podem ser obtidos a partir de plantas, animais ou insetos, sendo classificados em três grupos principais: o primeiro grupo contém heterociclos, tendo uma estrutura tetrapirrólica, como as clorofilas presentes em vegetais, ou o heme e as bilinas presentes em animais; o segundo grupo tem na sua composição carotenoides encontrados nos animais e plantas constituído por isoprenoide; e por fim, o terceiro grupo, que apresenta estruturas heterocíclicas contendo oxigénio, tais como flavonoides, e que são encontrados nos vegetais. (Hamerski, et al., 2013).



Os flavonoides são constituídos, na maioria dos casos (exceção feita às flavanonas, ver figura 2), por 3 anéis aromáticos, estando os anéis A e C fundidos, ligados por uma ligação covalente ao anel B. O anel C é um heterociclo derivado do pirano, isto é, possui um átomo de oxigênio na estrutura (figura 1). A partir da variação do estado de oxidação do anel C, surgem diferentes classes de flavonóides que são: antocianidinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e catequinas (figura 2).

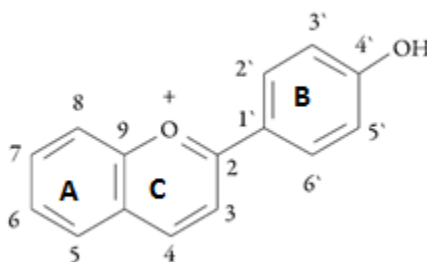


Figura 1: Estrutura simples de um flavonóide, neste caso uma antocianidina.

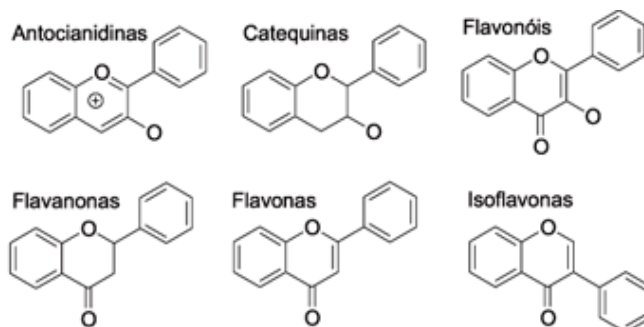


Figura 2: Estrutura química dos principais tipos de flavonóides (Março, et al., 2008).

Na tabela 1, encontram-se resumidos os principais grupos de corantes naturais, componentes e a fontes alimentares (Nijveldt, et al., 2001).

Tabela 1: Grupos de flavonóides, com componentes e fontes alimentares respetivamente (Nijveldt, et al., 2001).

Grupos	Componentes	Fonte alimentar
Flavonas	Apigenina Chrisina Kaempferol Luteolina Miricetina Rutina Sibelina Quercetina	Cascas de maçãs Cerejas Brócolis Peles de frutas <i>Cranberries</i> Uvas Alfices Oliva Alho
Flavanonas	Fisetina Hesperetina Narigina Naringenina Taxifolina	Frutas cítricas Peles de frutas cítricas
Catequinas	Catequina Epicatequina Epigallocatequina galate	Vinho tinto Chá
Antocianinas	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Peonidina Petunidina	Cerejas Uvas <i>Raspberries</i> Uvas vermelhas Morangos Chá Peles de frutas com pigmentos escuros

## 4.2. Antocianinas

Os frutos contêm, para além dos nutrientes essenciais, diversos compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis. Os compostos fenólicos, particularmente as antocianinas estão relacionados com a pigmentação dos frutos. (Kuskoski, et al., 2006). As antocianinas desempenham um papel definitivo na atração de animais para a polinização e dispersão de sementes, e portanto, eles são de valor considerável na interação entre animais e plantas (Kong, et al., 2003).

O interesse pelos pigmentos antocianinas tem vindo a aumentar devido à cor que conferem aos produtos, pela suas propriedades terapêuticas, anti carcinogénicos, antioxidantes e antivirais. Sendo assim a utilização de antocianinas como corantes para obtenção de produtos alimentares com cor, é um valor acrescentado para o consumo humano (Hagiwara, 2001), (Kapadia, 1997), (Youdim, et al., 2000).

As antocianinas representam o grupo mais importante de pigmentos hidrossolúveis na região visível. Estes pigmentos encontram-se acumulados nos vacúolos das células das diversas frutas, vegetais e cereais e são responsáveis pela gama de cores que varia entre o azul e o vermelho (Garzón, 2008).

As antocianinas são produtos formados no citoplasma e transportados e acumulados nos vacúolos por mecanismos ainda não compreendidos. Este transporte pode ocorrer em vesículas que se originam no local de síntese e são transportadas na corrente do citosol e, conseqüentemente se fundem no vacúolo (Creasy, 1982).

As antocianinas são derivadas das antocianidinas. A estrutura da antocianidina não possui grupos glicosídeos e na sua maioria possui grupos hidroxilo. No caso das antocianinas, um ou mais grupos hidroxilo estão ligados a açúcares, sendo o mais comum a glicose. O açúcar oferece à antocianina uma maior estabilidade e solubilidade comparada com as antocianidinas (Março, et al., 2008). Além disso, a estabilidade das antocianinas está relacionada com o número de grupos hidroxilo, sendo que as antocianinas que contêm mais grupos hidroxilo na sua estrutura são menos estáveis. No entanto o grau de metoxilação aumenta a estabilidade das antocianinas, pois a metoxilação favorece a tonalidade vermelha (Francis, 1989).

As antocianinas metoxiladas são mais estáveis que as hidroxiladas, uma vez que as moléculas orto-hidroxiladas são transformadas mais facilmente em quinomas (Bourzeix, 1976).

A cor natural das antocianinas, depende do padrão dos substituintes hidroxilo ou metoxilo no anel A ou B. Comparando a perlagonindina com a luteolinidina, ambas contêm o mesmo número de grupos OH, mas a luteolinidina apresenta um grupo OH na posição 3' no anel B enquanto a perlagonindina apresenta o mesmo grupo na posição 3 do anel C (Bechtold & Mussak, 2009). Desta maneira, a cor da luteolinidina é amarelo alaranjado e da pelargonidina é vermelha alaranjada (Harborne, 1993).





A tabela 2 descreve o efeito dos substituintes na cor das antocianidinas.

Tabela 2: Identificação estrutural das antocianidinas, efeito da substituição “R” (Castañeda-Ovando, et al., 2009)

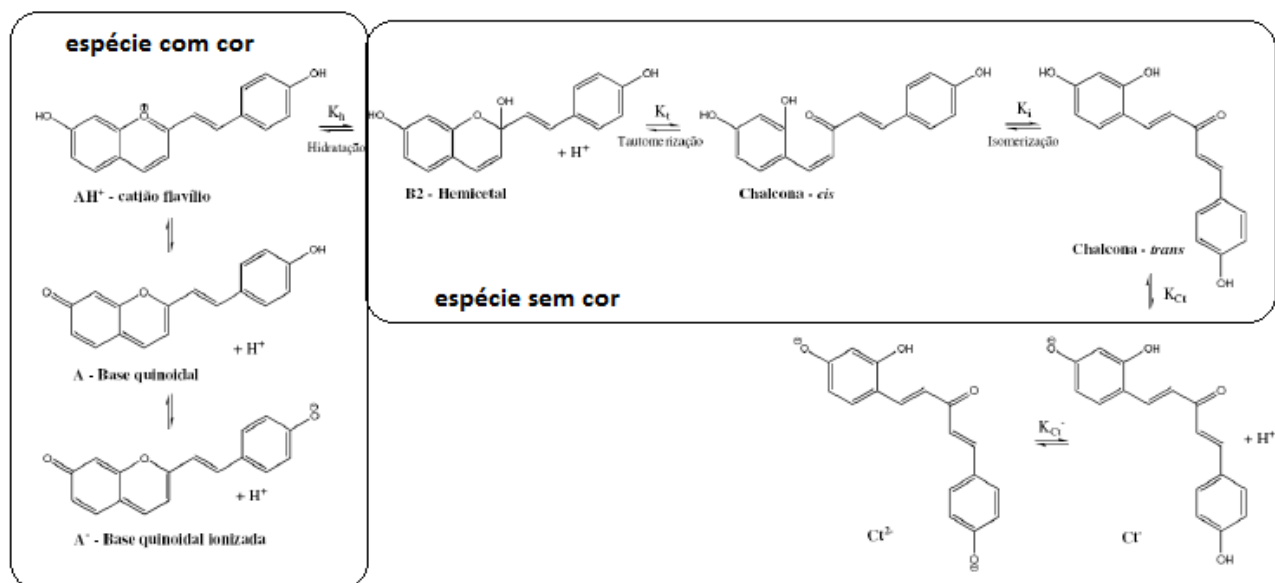
Name	Abbreviations	Substitution pattern							Colour
		$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	N.R. <sup>2</sup>
Arrabidin	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	
Aurantidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Blue-red
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	
Carajurin	Cj	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe	N.R. <sup>2</sup>
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Blue-red
3'-HydroxyAb	3'OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	N.R. <sup>2</sup>
6-HydroxyCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Red
6-HydroxyDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Blue-red
6-HydroxyPg	6OHPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	N.R. <sup>2</sup>
Luteolin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Blue-red
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange-red
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Riccionidin A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	N.R. <sup>2</sup>
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

As antocianinas quando em solução aquosa, podem existir em diferentes formas estruturais (esquema 1), o catião flavílio é a forma mais estável a pH ácido. O aumento do pH leva à formação de base quinoidal, carbinol (ou hemiacetal) e chalconas (podem existir na forma cis e trans).

As diversas cores observadas para uma antocianina ou antocianidina estão relacionadas com vários fatores, como a presença de outras moléculas capazes de estabilizar, uma das formas em particular é a associação com outros flavonóides, a complexação (interações com iões metálicos presentes nos alimentos) a autoassociação, o pH local do meio. O ambiente onde se encontra antocianina, a luz, a temperatura, a presença do oxigénio (Francis, 1989) também afetam a cor da antocianina.

As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas (Markakis, 1982). De acordo com o esquema 1, existem 5 espécies que estão envolvidas num equilíbrio complexo. O catião flavílio ( $AH^+$ ), é corado e como é termodinamicamente estável a pHs ácidos, é responsável pela cor do composto nessas condições.

No entanto quando ocorre o aumento do pH ocorrem dois processos em competição, uma desprotonação conduz à formação de uma base quinoidal A, sendo esta espécie também corada; a hidratação da espécie  $AH^+$  leva à formação de hemiacetal  $B_2$ , espécie que apenas absorve no UV e portanto não contribui para a cor. Salienta-se que a reação de hidratação é a mais lenta que a desprotonação, no entanto o hemiacetal é mais estável termodinamicamente. O hemiacetal pode ainda sofrer tautomerização, ocorrendo a formação da chalcona *cis* (Cc), que por fim pode isomerizar formando a chalcona *trans* (Ct). No equilíbrio termodinâmico, a espécie dominante é a chalcona *trans* (Ct, pouco coradas), esta espécie é dominante a pHs pouco ácidos ou neutros, e sensível à luz (por ação da luz pode ser convertida a Cc, B2 ou mesmo ao  $AH^+$  ou A, dependendo do pH. (Moncada, et al., 2003).



Esquema 1: Modificações estruturais das antocianinas em solução aquosa.

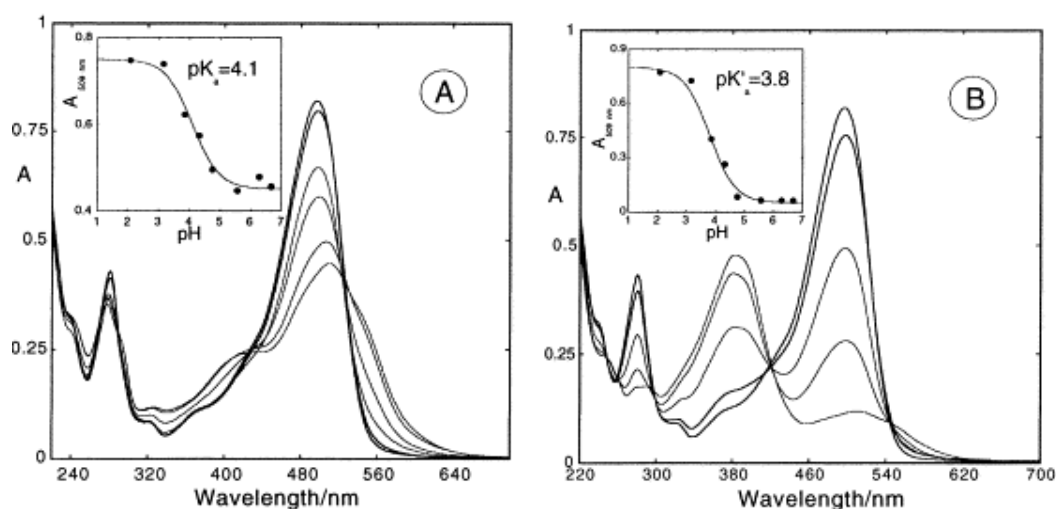


Figura 3. (A) Espectro de absorção de luteolinidina em metanol/água (3:1), imediatamente após o salto de pH. (B) Espectro de absorção da solução de luteolinidina após dois dias no escuro (Melo, et al., 2000).

Na figura 3A corresponde a luteolinidina em metanol/água (3:1). Os espectros representados foram obtidos imediatamente após um salto de pH para vários valores de pH entre 2 e 7 a partir de uma solução previamente equilibrada a pH=1 (Melo et al. 2000). A pHs mais baixos apresentam, uma banda a 494 nm, característica do cátion flavílio  $AH^+$ , e a pHs mais altos pode ver-se a formação instantânea de base que absorve a cerca de 510nm com um ombro a cerca de 540nm. Na figura 3B, pode ver-se que após as soluções atingirem o equilíbrio aos mesmos pHs (repouso no escuro durante dois dias), a concentração de cátion flavílio  $AH^+$ , e base quinoidal, A (as espécies responsáveis pela cor da antocianidinas), diminuiu significativamente aos pHs mais elevados, ou seja, a solução perde a cor.

Os insets da figura 3 mostram o comportamento do cátion flavílio ( $AH^+$ ), a 494nm com o aumento do pH, imediatamente após o salto de pH, e no equilíbrio.

Este comportamento é explicado pela formação de Ct, a espécie termodinamicamente mais estável a pHs mais elevados. A base quinoidal que se forma instantaneamente, é um produto cinético, que vai escoando para Ct através do cátion flavílio.

Apesar da formação de Ct implicar a passagem por hemiacetal e chalcona cis, não há nenhuma evidência espectral da presença de B e Cc no equilíbrio, pois a concentração destas espécies é muito baixa e são espécies transientes (não acumulam) (Melo, et al., 2000).

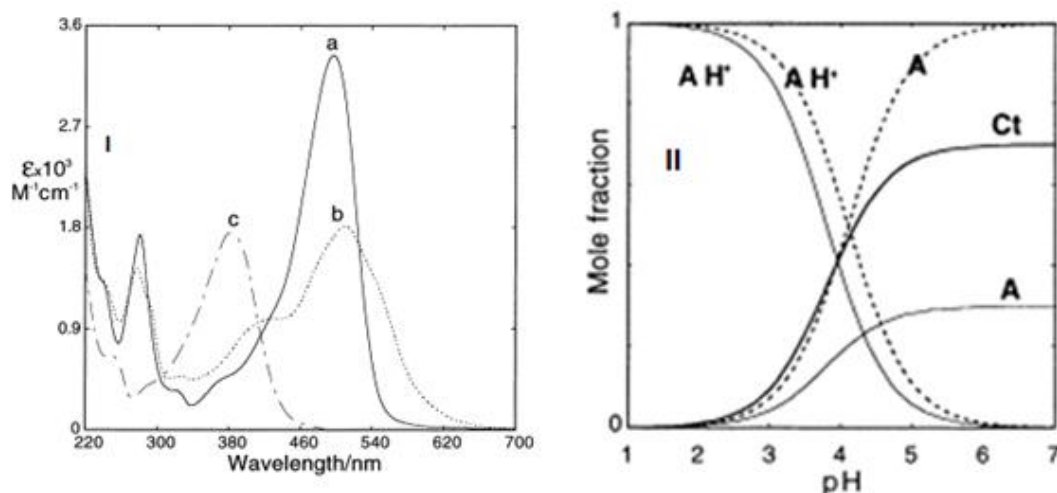


Figura 4: (I) espectro de absorção de espécies a partir da luteolinidina em água/metanol (3:1) a 25°C, (-) AH<sup>+</sup>, (....) A e (---) Ct. (II) fração molar em função do pH (Melo, et al., 2000).

Na figura 4, encontram-se os espectros de absorção de três espécies que aparecem no equilíbrio termodinâmico. A espécie AH<sup>+</sup> é representado por a pH=2; b é representado pela espécie A obtido imediatamente após um salto de pH de 1 a 5; C em que esta representado a espécie Ct (Melo, et al., 2000).

De referir que a figura 4-II nos permite quantificar as diferentes espécies em equilíbrio através das suas frações molares. No imediato, após o salto de pH de ácido (pH=1) para condições mais básicas (pH>2), apenas estão presentes as espécies AH<sup>+</sup> e A. Ao longo do tempo, observa-se uma conversão de A para Ct, o que confirma esta última como a espécie mais estável a pHs neutros.

#### 4.3. Impacto do meio e da concentração na cor

Em soluções de antocianinas com concentrações maiores que  $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , a absorção eletrónica apresenta um desvio em relação à lei de Lambert-Beer, e as moléculas tendem a agregar através do empilhamento vertical, resultado das interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos. Este fenómeno, conhecido como auto-associação, é observado para o catião flavílio e para a base quinoidal, pois a estrutura planar de ambas as espécies favorece este tipo de interação, e provoca a intensificação da absorção, destas espécies, além de diminuir a hidratação da forma catiónica (Hoshino, et al., 1981).

As antocianinas podem ainda agregar com outras moléculas, chamadas co-pigmentos. Os co-pigmentos em si, são compostos incolores, no entanto quando associados às antocianinas geram uma mudança na intensidade da cor. Investigações sugerem que a co-pigmentação de antocianinas é um dos principais mecanismos de estabilização da cor em plantas (Castañeda-Ovando, et al., 2009).

A forma  $\text{AH}^+$ , (catião flavílio) é a forma que assegura a cor então a antocianina é apenas aplicada em alimentos ácidos ( $\text{pH} < 3$ ). No entanto se a antocianina for acilada, ocorre uma maior resistência a hidratação e portanto possui uma maior estabilidade de cor, a pHs mais elevados. A estabilização deve-se ao empilhamento dos grupos acilos com os anéis do catião flavílio, reduzindo assim a suscetibilidade do ataque nucleófilo da água, impedindo a formação de chalcona (Timberlake & Bridle, 1997).



#### 4.4. Água/ Liofilização

A água ataca o catião flavílio formando a hemiacetais e chalconas (incolores). Desta forma o ideal seria eliminar a água ou diminuir a quantidade de água do meio para que o catião flavílio permanecesse livre. Uma das formas seria a desidratação osmótica ou a liofilização.

No entanto o impacto da redução de água tem por vezes o efeito contrário devido a mudanças de polaridade do meio que estabilizam as diferentes formas, como se pretende mostrar neste trabalho.

A desidratação osmótica de alimentos baseia-se na remoção parcial da água pela pressão quando se coloca o produto em contato com a uma solução hipertônica de solutos. A vantagem da desidratação é o aumento do tempo de vida útil do produto, e, a melhoria da estabilidade microbiológica durante todo o período de armazenamento. Apesar disso, esta técnica é pouco praticada porque aumenta o investimento logo aumenta os preços dos produtos submetidos a pressão osmótica (Gomes, et al., 2007).

A alternativa passa por vezes pela liofilização, uma técnica de secagem, que constitui na eliminação da água através da sublimação. A água presente no alimento passa do estado sólido para o estado gasoso, quando submetido a baixas pressões e temperaturas baixas. Este tipo de técnica é indicada para produtos que tenham elementos sensíveis ao calor pois a liofilização conserva as propriedades nutritivas. As membranas das células não se rompem com a perda da água (Ribeiro, 2012).

Qualquer dos processos de remoção de água leva a uma mudança de polaridade do meio que pode afetar a estabilidade das diferentes formas no equilíbrio das antocianinas.



## 5. Parte experimental

A luteolinidina foi adquirida a Extrasynthese (Genay, França). O acetato de sódio foi adquirido à Aldrich (St. Louis, USA). O Metanol utilizado na preparação de todas as soluções foi de grau HPLC, obtido na Carlo-Erba (Sabadell, Espanha). A água utilizada na preparação de todas as soluções foi de qualidade MiliQ.

A concentração das espécies em equilíbrio e das respectivas constantes foram estudadas através de espectroscopia de UV/vis, sendo utilizado um aparelho CARY 5000 UV/Vis. Os espectros foram adquiridos em células de Plastibrand® (Aldrich, St. Louis, USA) de 1cm de percurso ótico, com capacidade de 3mL.

A preparação das soluções foi feita do seguinte modo:

- (1) Preparou-se uma solução-mãe de luteolinidina, cuja concentração foi determinada pelo valor da absorvância dessa solução a 480nm, aplicando a lei de Lambert-Beer ( $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ ), assumindo o valor de  $\epsilon$  da literatura foi de  $3600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Pina, et al., 2000), sendo o percurso ótico  $b$  igual a 1cm.
- (2) Diluiu-se 1mL de solução-mãe em água, ajustando-se ao pH desejado com soluções de HCl e NaOH.
- (3) Perfez-se até 10mL, de modo a obter a proporção desejada de água:metanol.

Os valores de pH foram medidos em solução aquosa *Crison pH-meter basic 20*, sendo adicionado o metanol (na proporção desejada) *à posteriori*.

O espectro de cada amostra foi adquirido imediatamente após o ajuste de pH e regularmente durante os dias seguintes até que não se verificassem mais alterações espectrais, isto é, até que atingisse o equilíbrio termodinâmico. Este tempo variou entre 4 e 32 dias, dependendo das condições de cada amostra.

As concentrações obtidas foram transformadas em frações molares dividindo a concentração obtida no espectro pela concentração total de antocianidina.



As frações molares foram ajustadas com as equações (1.8) a (1.12), usando como parâmetros ajustáveis as constantes de equilíbrio, e minimizando a distância entre os pontos experimentais e os calculados através do SOLVER®, ferramenta do Microsoft Excel.

O estudo de acetato como co-pigmento para estabilização da cor da luteolinidina foram efetuados de maneira análoga aos estudos em solução aquosa. Resumidamente, juntou-se 1mL de solução-mãe de luteolinidina em água à proporção desejada de metanol e de uma solução de acetato de sódio (0.1M), ajustada anteriormente ao pH desejado.

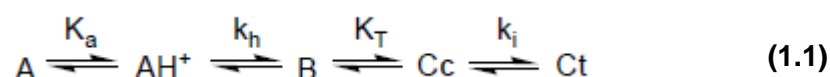




## 6.Resultado e Discussão

### 6.1. Comportamento da luteolinidina em água

De acordo com o esquema 1 (Melo, et al., 2002), existem cinco espécies de antocianidina que estão presentes numa solução ácida ou neutra, o que pode ser descrito através do seguinte equilíbrio global:



De modo a compreender o comportamento da luteolinidina e dos vários equilíbrios químicos envolvidos no sistema, traçaram-se espectros de absorção em água a diferentes pHs (figura 5). Este comportamento foi seguido ao longo do tempo, até que se atingisse o equilíbrio, isto é, não se verificassem mais alterações espectrais.

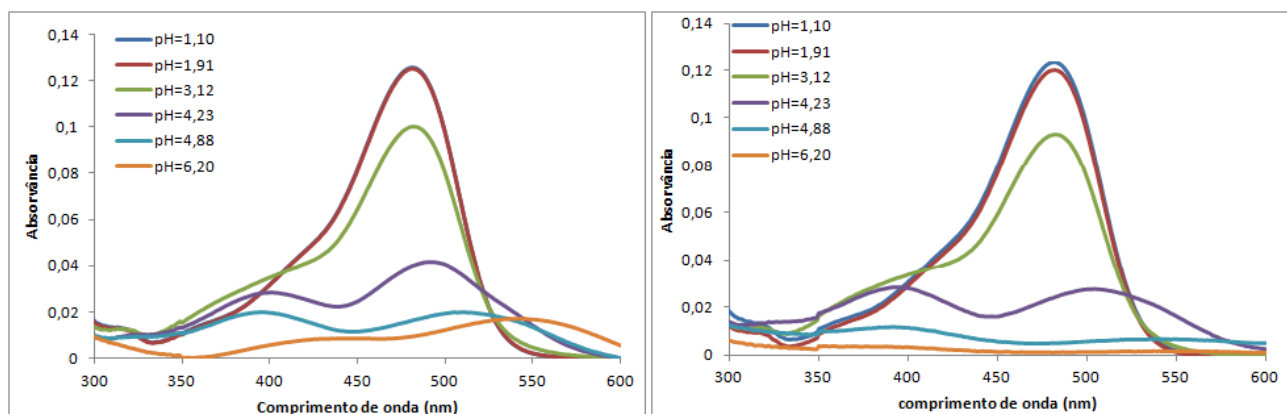


Figura 5: Variação dos espectros de absorção da luteolinidina em água adquirido (I) de imediato e (II) após 32 dias, a diferentes pHs. Comprimento de onda de absorção máxima para cada uma das espécies: 390nm (Ct), 489nm (AH<sup>+</sup>) e 515nm (A).

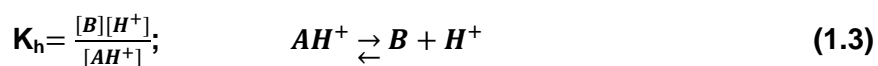
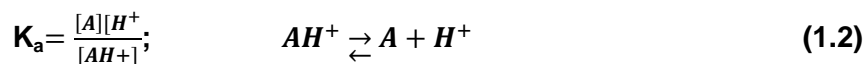
De acordo com os espectros de absorção na figura 5, no primeiro dia (I), a espécie dominante é o catião flavílico ( $AH^+$ ), tendo uma absorção máxima a 480nm a pH=1.10 e pH=1.91. No entanto, a pH=3.12 verifica-se a formação da chalcona *trans* (Ct) e da base quinoidal (A), tendo absorção máxima de 390 e 520nm, respetivamente.

Desta forma, verificou-se que as espécies A e Ct não estão presentes (ou não tem absorvância significativa) a pH inferior a 3, tal como esperado.

Ao longo do intervalo de tempo estudado, verifica-se que a  $AH^+$  é a espécie dominante no equilíbrio sob condições ácidas (pH inferior a 3). Quando o pH aumenta o catião flavílio desaparece através de duas vias (i) desprotonação para formar a base quinoidal (A); (ii) hidratação para formar a hemiacetal (B) que, por sua vez, tautomeriza para originar chalcona *cis* (Cc) e isomeriza para originar chalcona *trans* (Ct). As espécies B e Cc não são observadas no espectro de absorção pois a concentração é demasiada baixa no equilíbrio porque são espécies transientes (não se acumulam).

## 6.2. Determinação das constantes de equilíbrio do sistema

Como já referido anteriormente, a luteolinidina pode-se apresentar sob a forma de cinco espécies diferentes que estão interligadas através de quatro equilíbrios cujas constantes podem ser descritas da seguinte maneira para cada um deles:



Sabendo que a concentração total de luteolinidina é igual à soma de todas as concentrações presentes,

$$C_0 = [A] + [AH^+] + [B] + [Cc] + [Ct] \quad (1.6)$$

$$\frac{C_0}{[AH^+]} = 1 + \frac{Ka}{[H^+]} + \frac{Kh}{[H^+]} + \frac{KhKt}{[H^+]} + \frac{KiKhKt}{[H^+]} = \alpha \quad (1.7)$$

Podendo assim, determinar as frações molares de cada espécie no equilíbrio:

$$X_{AH^+} = \frac{1}{\alpha}; \quad (1.8)$$

$$X_A = \frac{X_{AH^+}Ka}{[H^+]} \quad (1.9)$$

$$X_B = \frac{X_{AH^+}Kh}{[H^+]} \quad (1.10)$$

$$X_{Cc} = \frac{X_{AH^+}KhKt}{[H^+]} \quad (1.11)$$

$$X_{Ct} = \frac{X_{AH^+}KhKtKi}{[H^+]} \quad (1.12)$$

Tendo em conta que as espécies presentes podem absorver luz em toda gama de UV/visível, para cada comprimento de onda sabe-se:

$$\begin{aligned} \frac{A(\lambda)}{C_0} = & (\epsilon_{AH^+} \times X_{AH^+}) + \left[ \epsilon_A \times \left( \frac{X_{AH^+}Ka}{[H^+]} \right) \right] + \left[ \epsilon_B \times \left( \frac{X_{AH^+}Kh}{[H^+]} \right) \right] + \left[ \epsilon_{Cc} \times \left( \frac{X_{AH^+}KhKt}{[H^+]} \right) \right] + \\ & \left[ \epsilon_{Ct} \times \left( \frac{X_{AH^+}KhKtKi}{[H^+]} \right) \right] \end{aligned} \quad (1.13)$$

Sabendo que B e Cc são espécies transientes:

$$X_B \approx X_{Cc} \approx 0 \quad (1.14)$$

Logo:

$$\frac{A(\lambda)}{C_0} = (\epsilon_{AH^+} \times X_{AH^+}) + (\epsilon_A \times X_A) + (\epsilon_B \times X_B) + (\epsilon_{Cc} \times X_{Cc}) + (\epsilon_{Ct} \times X_{Ct}) \quad (1.15)$$

$$\frac{A(\lambda)}{C_0} = (\epsilon_{AH^+} \times X_{AH^+}) + (\epsilon_A \times X_A) + (\epsilon_{Ct} \times X_{Ct}) \quad (1.16)$$

Através desta fórmula é possível determinar a absorvância total do sistema de acordo com a contribuição de cada uma das espécies para essa absorvância, o que nos permite fazer o ajuste teórico em relação aos valores experimentalmente obtidos para cada comprimento de onda. Assim é possível determinar o pKa de cada solução. Este ajuste foi feito utilizando a ferramenta SOLVER® do Microsoft Excel, para todos os sistemas de solventes (ver Anexos). Os valores obtidos encontram-se descritos na tabela 3.

O equilíbrio químico global pode então ser descrito da seguinte maneira simplificada



em que

$$CB = A + B + Cc + Ct \quad (1.18)$$

Tendo em conta o referido em 1.14, Ka' pode então ser definida como:

$$K_a' = K_a + K_h K_t K_i \quad (1.19)$$



Desta maneira, a perda de cor do sistema é exclusivamente determinada pela formação de A ( $K_a$ ) ou Ct ( $K_hK_tK_i$ ).

A pHs ácido, a cor é garantida pela presença da espécie  $AH^+$ . O favorecimento de umas destas espécies em prol da outra é ditado pelas constantes  $K_a$  (formação de A e consequente promoção de cor) e pelo produto  $K_hK_tK_i$  (formação de Ct e consequente degradação da cor).

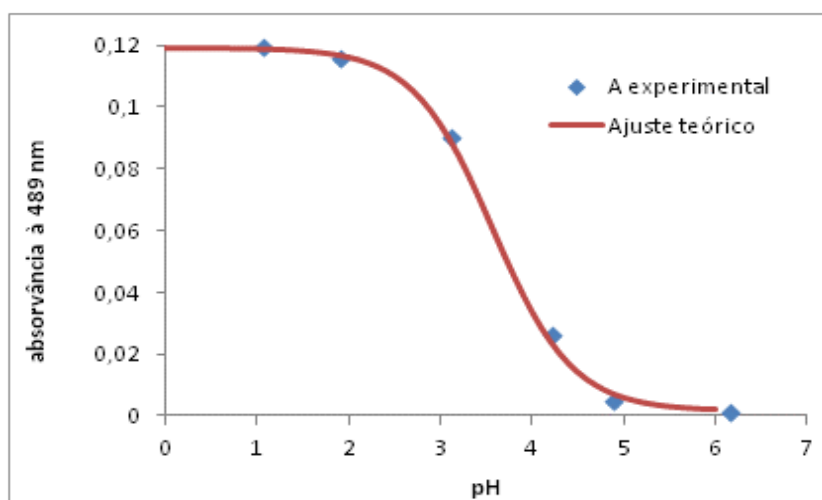


Figura 6: Luteolinidina em água. Espectro de absorção experimental e ajuste teórico a 489nm . O ajuste foi obtido para os valores de  $K_a=2.5 \times 10^{-4} M$  e  $K_hK_tK_i=1.8 \times 10^{-5} M$ .

De modo a simular os processos de secagem sofridos pela luteolinidina, efetuaram-se os mesmos estudos em misturas de metanol/água em diferentes proporções. A figura 7 descreve esse comportamento relativamente à mistura específica de metanol/água na proporção 90:10.

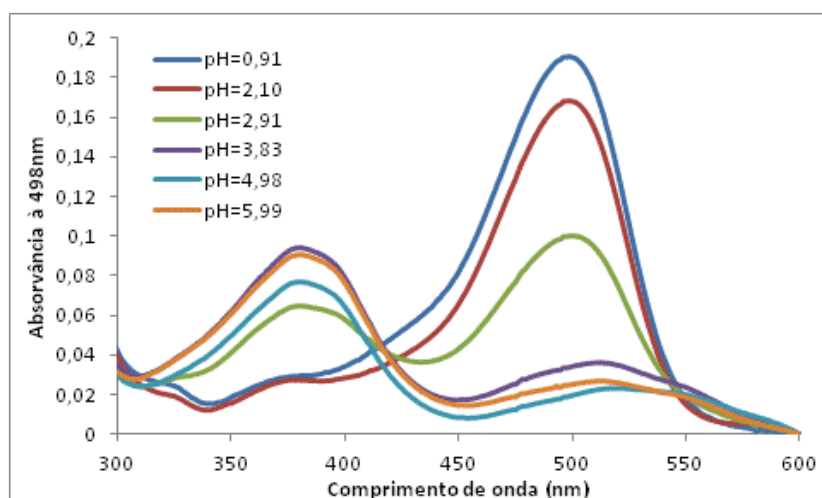


Figura 7. Espectros de absorção da luteolinidina em mistura de água/metanol 10:90, a diferentes pHs, ao atingir o estado termodinâmico.

Comparando a figura 7 (água/metanol 10:90) com a figura 5-II (só água), verifica-se a presença de Ct e A pelo aparecimento das bandas a cerca de 390nm e 510nm, respetivamente. Tendo em conta a absorvância das bandas e os valores de absorvidade molar descritos na literatura (Melo et al. 2002), verifica-se uma presença maioritário de Ct em relação a A, o que resulta numa significativa perda de cor do sistema. Isto é facilmente visível através das frações molares das espécies a diferentes pHs (figura 8), que foram calculadas com base nas constantes obtidas pelas equações 1.8 a 1.12.

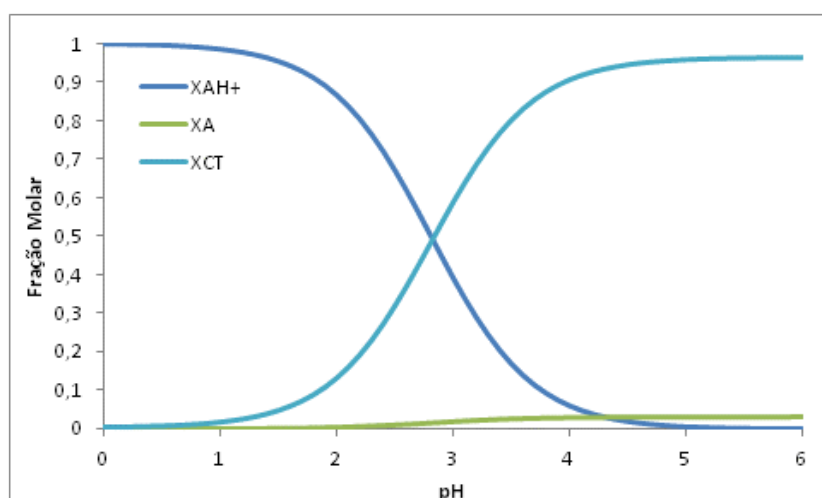


Figura 8: Fração molar calculada das espécies envolvidas ( $X_{AH^+}$ ,  $X_A$  e  $X_{Ct}$ ) em água:metanol a diferentes pHs (10:90).

Analisando os valores obtidos para as constantes  $K_a$  e  $K_hK_tK_i$  em relação à quantidade de água do sistema, verificou-se simultaneamente uma descida no valor de  $K_a$  e uma subida no valor do produto  $K_hK_tK_i$ , ou seja, é favorecida a formação de  $C_t$  relativamente a  $A$ , o que se traduz numa perda de cor do corante (figura 9).

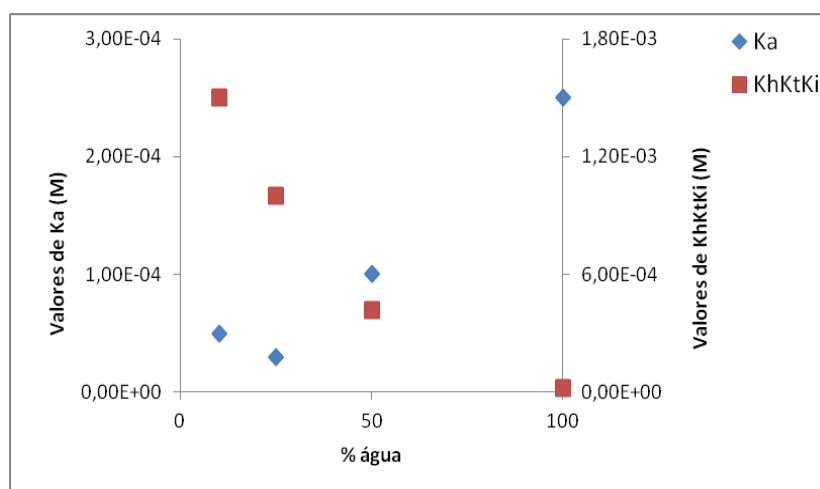


Figura 9: Variação de  $K_a$  e  $K_hK_tK_i$  em função da percentagem de água.

Isto vai contra a expectativa de que, ao retirar água do sistema, a hidratação do catião flavílio diminui, o que favoreceria a estabilidade da cor. De fato, a redução na percentagem de água promove a hidratação porque as espécies não carregadas são estabilizadas em ambientes de menor polaridade.

### 6.3. Comportamento da luteolinidina na presença de aditivos

De modo a verificar se a cor da luteolinidina podia ser estabilizada mediante a adição de um co-pigmento durante o processo de secagem, estudou-se o comportamento da mesma na presença de acetato, em condições análogas aos estudos efetuados em água, i.e. variando a quantidade de água (em metanol) e pH (figura 10).

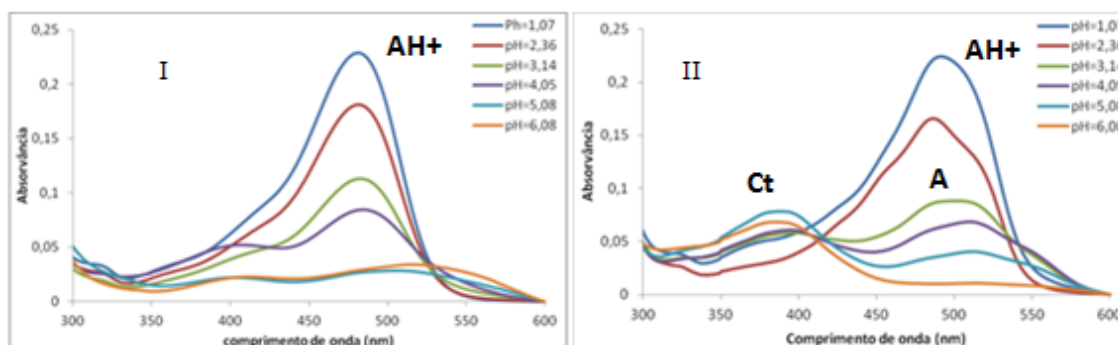


Figura 10: Espectros equilibrados de absorção de luteolinidina em solução aquosas de acetato com diferentes quantidades de metanol: (I) 100:0 , (II) 10:90.

Comparando a figura 10 com as figuras 5-I e 7, é notória a presença de maior quantidade de A para pHs entre 3 e 5 na presença de acetato, pela absorvância da banda a cerca de 510nm, o que sugere que o acetato pode funcionar como co-pigmento para estabilização da cor da luteolinidina em processos de secagem.

Como especificado anteriormente, o cálculo das constantes  $K_a$  e  $K_h K_t K_i$  fornece informação quantitativa sobre a intensidade da cor no equilíbrio. A figura 11 descreve a variação destas constantes em função da percentagem de água.

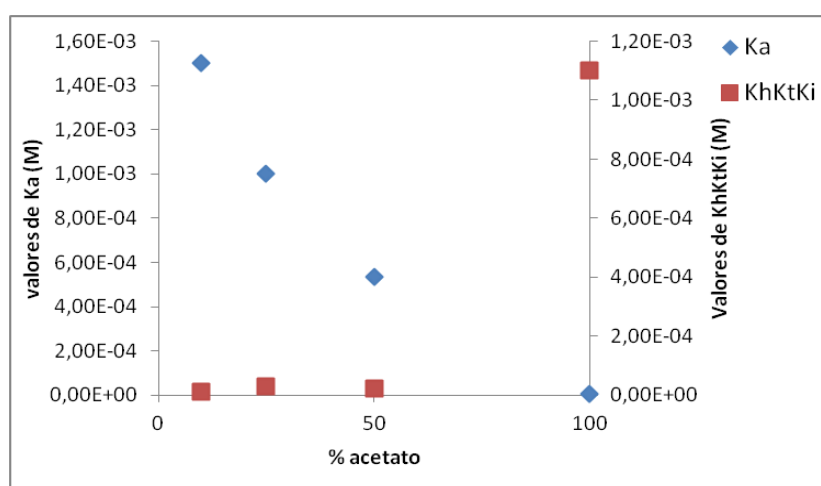


Figura 11: Variação de  $K_a$  e  $K_h K_t K_i$  em função da percentagem de água, na presença de acetato.



Ao contrário para soluções só em água, na presença de acetato verifica-se um aumento de  $K_a$  e simultaneamente uma diminuição no produto  $K_h K_t K_i$ , à medida que retiramos a água do sistema. Assim, a variação das constantes  $K_a$  e  $K_h K_t K_i$  em diferentes misturas de acetato/metanol indica-nos uma tendência de estabilização da espécie A em ambientes com a polaridade reduzida, o que resulta numa maior intensidade de cor do sistema nestas condições, quando comparado com a solução aquosa na ausência de acetato.

A tabela 3 sumariza os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 3: Valores das constantes termodinâmicas para o sistema de luteolinidina com diferentes quantidades de água, metanol e acetato.

	Água	Água/MeOH (50:50)	Água/MeOH (25:75)	Água/MeOH (10:90)	Acetato	Acetato/ MeOH (50:50)	Acetato/ MeOH (25:75)	Acetato/ MeOH (10:90)
$K_a$	2,50E-04	1,00E-04	3,00E-05	5,00E-05	2,03E-06	5,31E-04	1,00E-03	1,50E-03
$pK_a$	3,60E+00	4,00E+00	4,52E+00	4,30E+00	5,70E+00	3,27E+00	3,00E+00	2,82E+00
$C_0$	1,98E-05	6,33E-05	6,33E-05	6,33E-05	9,73E-05	5,97E-05	5,97E-05	5,97E-05
$K_a'$	2,68E-04	5,21E-04	1,03E-03	1,55E-03	9,71E-05	8,31E-04	1,79E-03	1,15E-03
$pK_a'$	3,57E+00	3,28E+00	2,99E+00	2,81E+00	2,96E+00	3,08E+00	2,75E+00	2,94E+00
$K_h K_t K_i$	1,80E-05	4,20E-04	1,00E-03	1,50E-03	1,10E-03	2,16E-05	2,64E-05	9,54E-06

## 7. Conclusão

Através deste estudo concluiu-se que a estabilidade da cor da luteolinidina é influenciada pela diminuição da água e pela presença do anião acetato.

A simulação do processo de secagem por diminuição da quantidade de água num solvente orgânico menos polar resultou num aumento da perda de cor da luteolidinina, por promoção da formação de chalcona *trans* (Ct) em prol de base quinoidal (A).

A adição de anião acetato em soluções com diferentes quantidades de água permitiu uma melhoria da estabilização da cor do sistema, por favorecimento do equilíbrio no sentido de promoção da formação de A em relação a Ct.

Dada importância da intensidade da cor destes compostos na sua utilização como corantes alimentares, o acetato surge como um potencial candidato para a sua aplicação em processos de secagem industrial de alimentos contendo corantes sintéticos.

Este trabalho pode impulsionar futuros estudos sobre a utilização deste ou de outros co-pigmentos de baixo custo no processamento industrial de alimentos.



## 8. Anexo

As figuras seguintes mostram os mesmos estudos em água e em mistura água/metanol em diferentes proporções (50:50; 25:75 e 10:90). Além disso e de modo a simular os processos de secagem sofridos pela luteolinidina, efetuaram-se os mesmos estudos na presença do tampão acetato com as diferentes proporções (50:50; 25:75 e 10:90).

### Luteolinidina em água

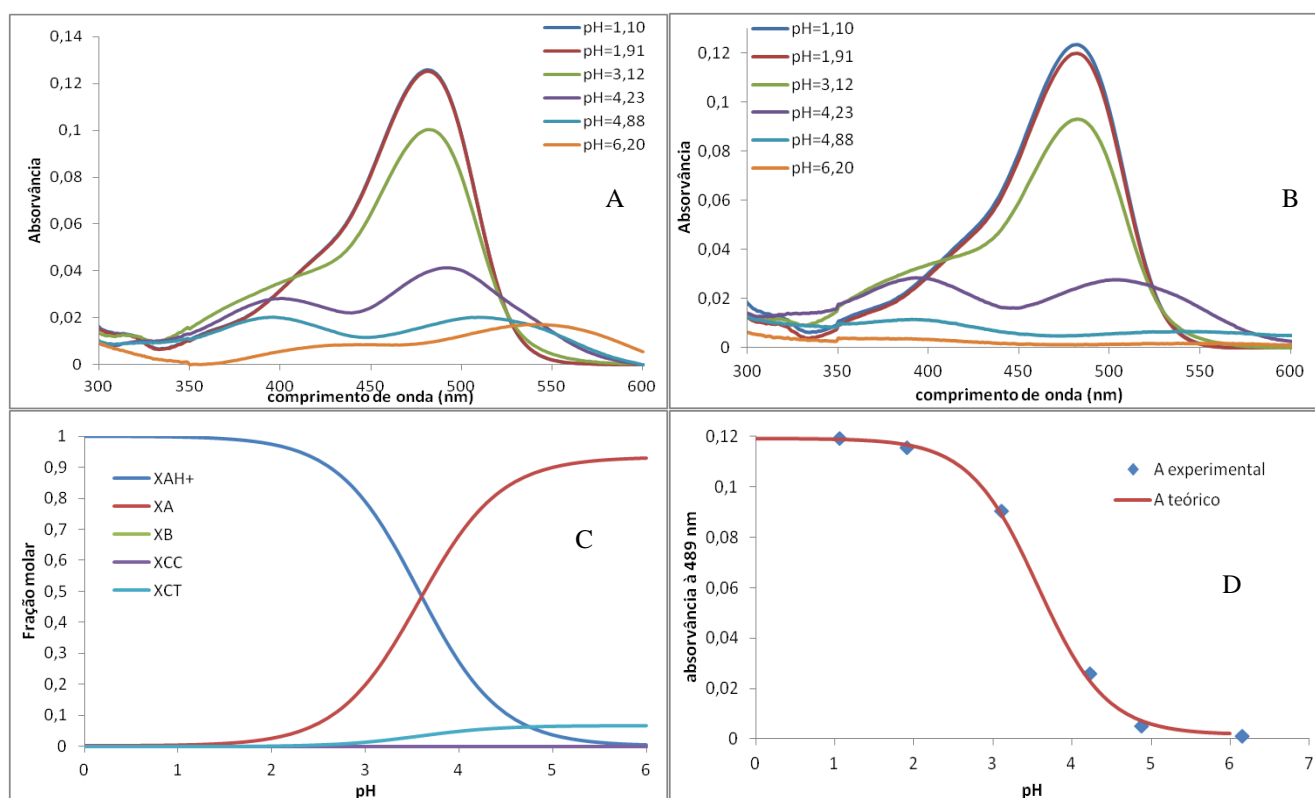


Figura A1: Comportamento da Luteolinidina em água. (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 32 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorbância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 2,50E-04$  e  $K_h K_t K_i = 1,80E-05$ .

### Luteolinidina água/metanol (50:50)

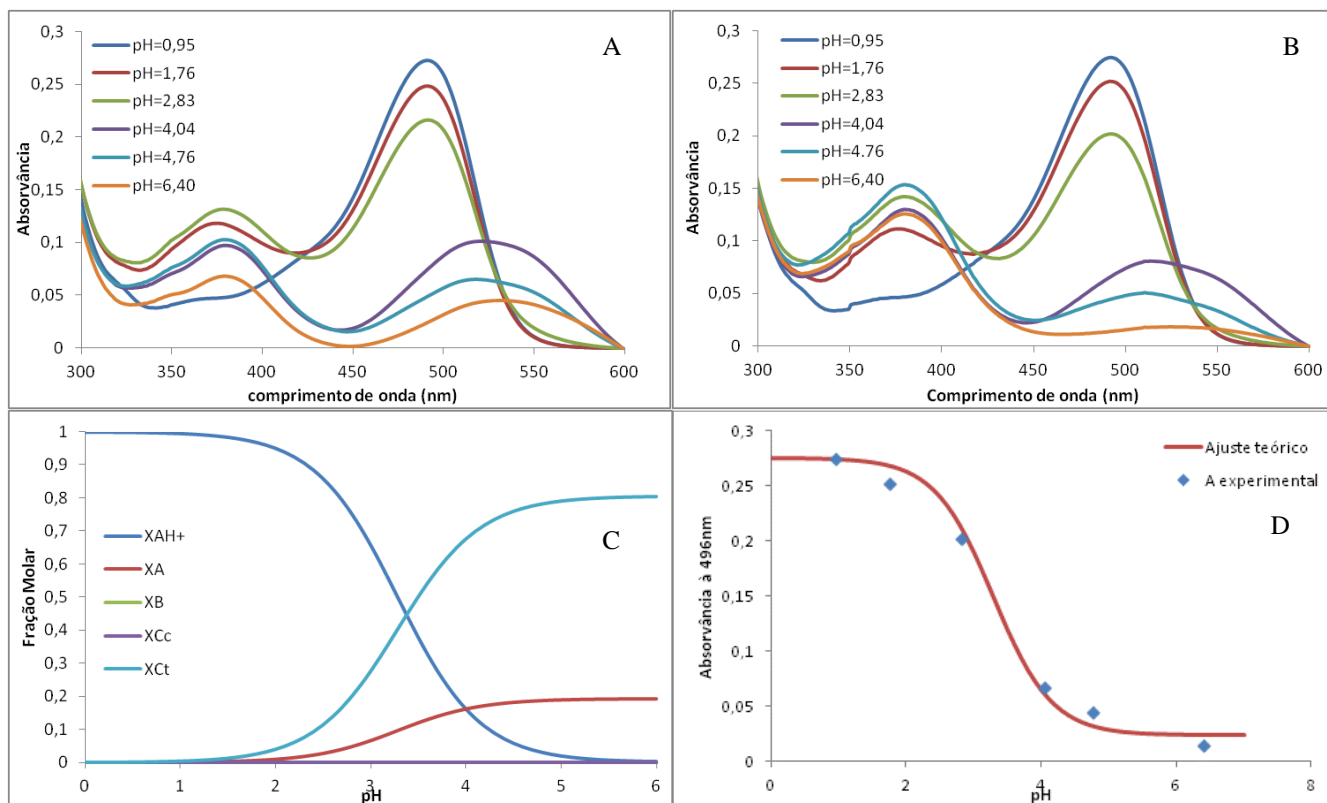


Figura A2: Comportamento da Luteolinidina em água/metanol (50:50). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 3 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 1,00E-04$  e  $K_h K_t K_i = 4,20E-04$ .

### Luteolinidina água/metanol (25:75)

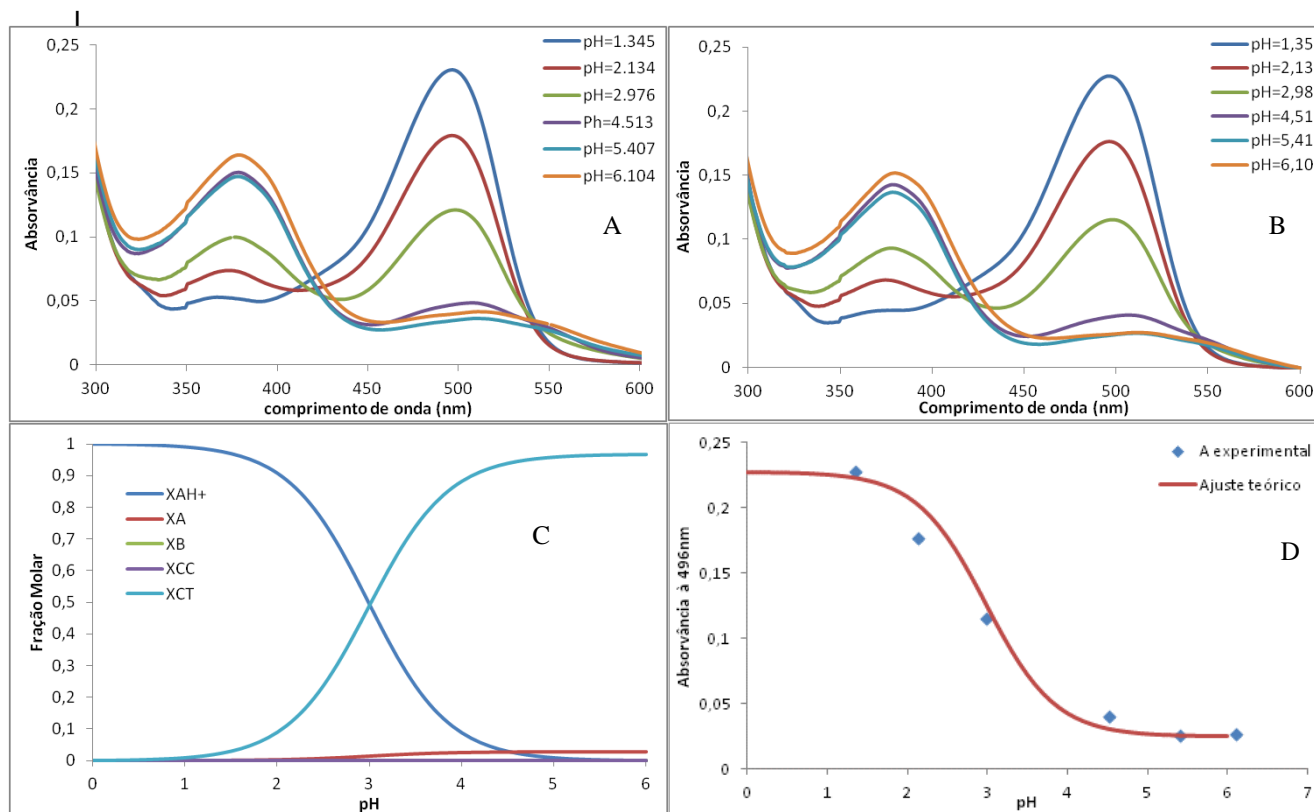


Figura A3: Comportamento da Luteolinidina em água/metanol (25:75). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 11 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 3,00E-05$  e  $K_h K_t K_i = 1,00E-03$ .

### Luteolinidina água/metanol (10:90)

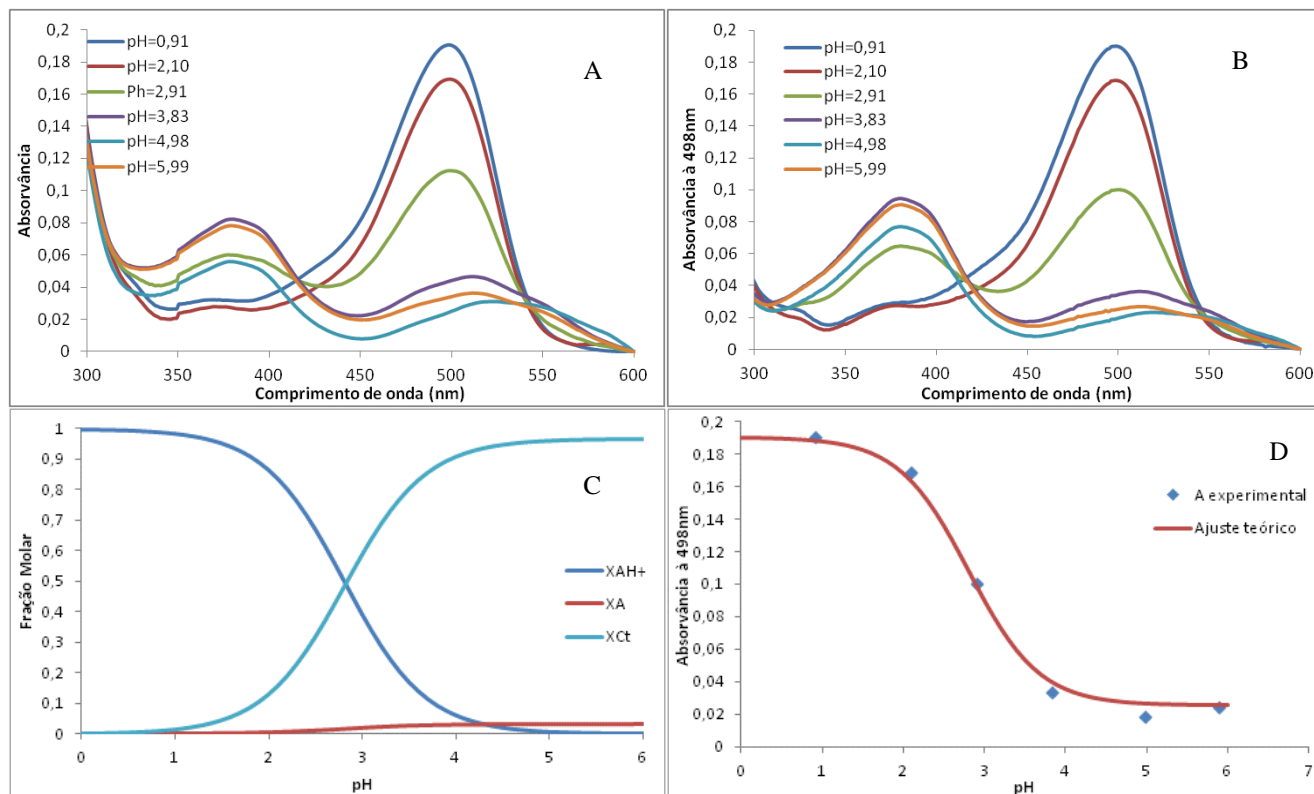


Figura A4: Comportamento da Luteolinidina em água/metanol (10:90). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 3 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de  $AH^+$  em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 5,00E-05$  e  $K_h K_t K_i = 1,50E-03$ .

### Luteolinidina em tampão acetato

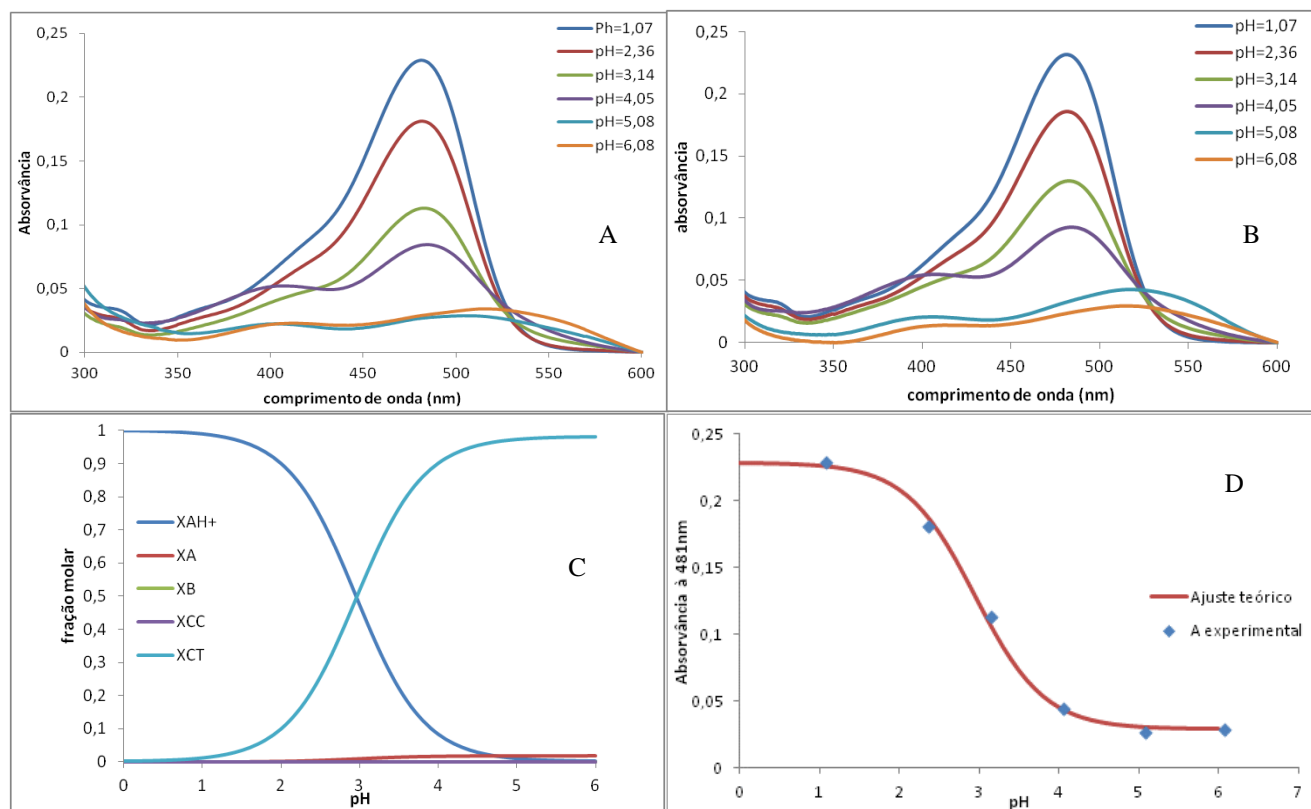


Figura A5: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato . (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 2,03E-06$  e  $K_h K_t K_i = 1,10E-03$ .

### Luteolinidina em tampão acetato/metanol (50:50)

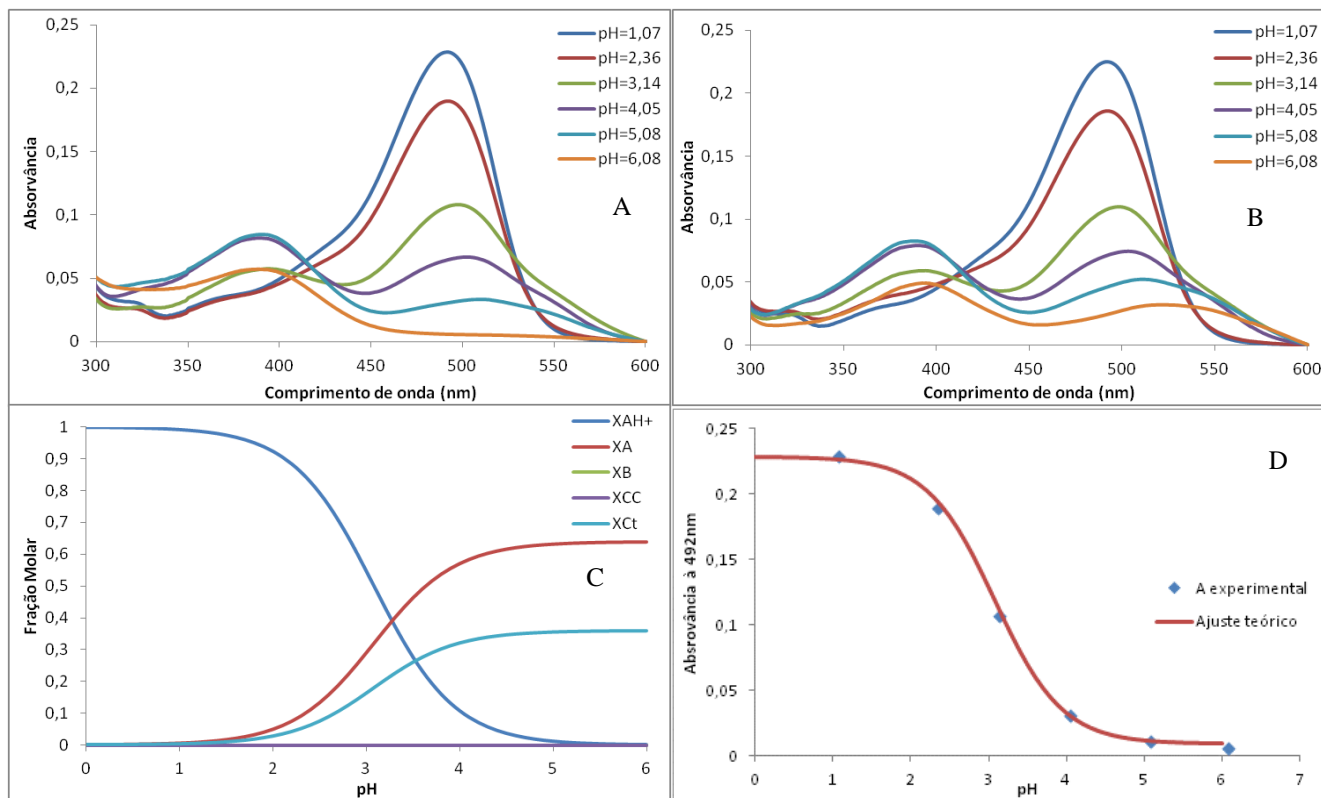


Figura A6: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato/metanol (50:50). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorbância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 5,31E-04$  e  $K_h K_t K_i = 2,16E-05$ .



### Luteolinidina em tampão acetato/metanol (25:75)

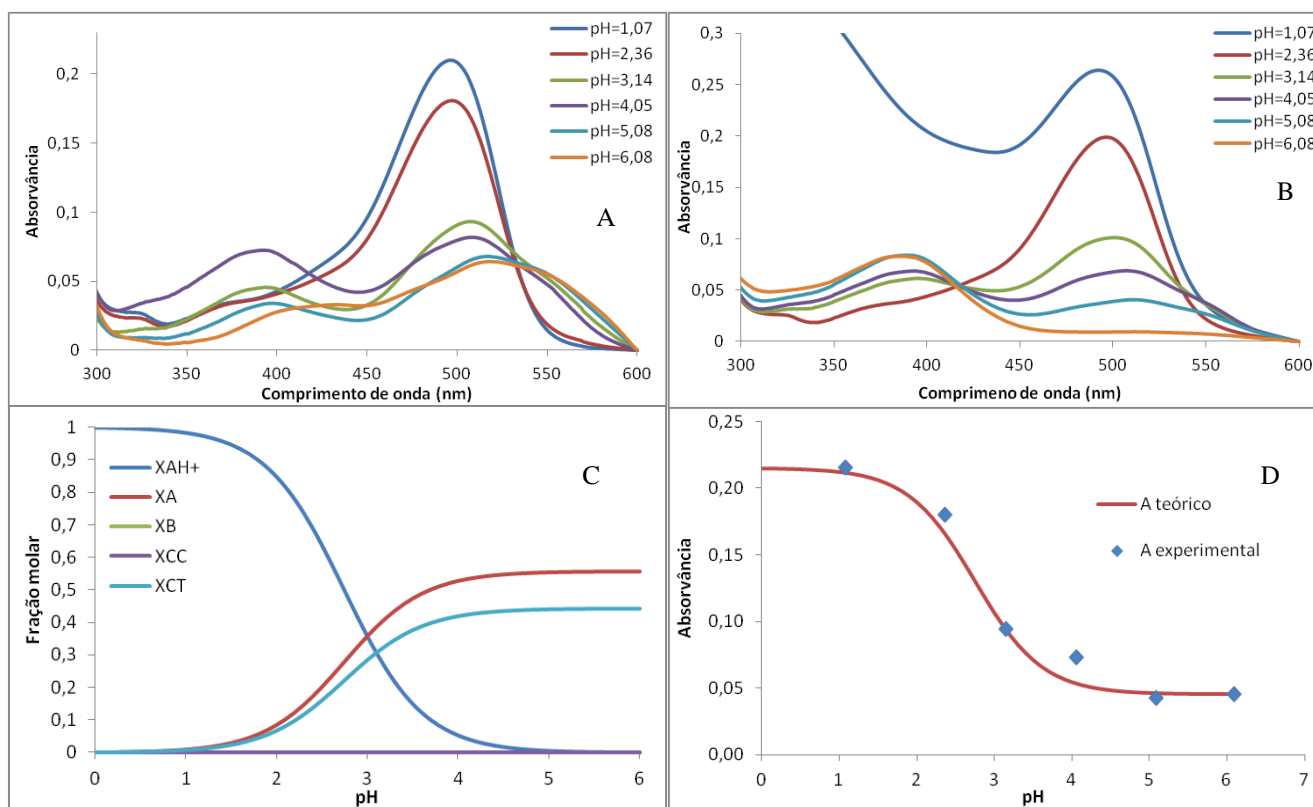


Figura A7: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato/metanol (25:75). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorbância de AH+ em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 1,00E-03$  e  $K_h K_t K_i = 2,64E-05$ .

### Luteolinidina em tampão acetato/metanol (10:90)

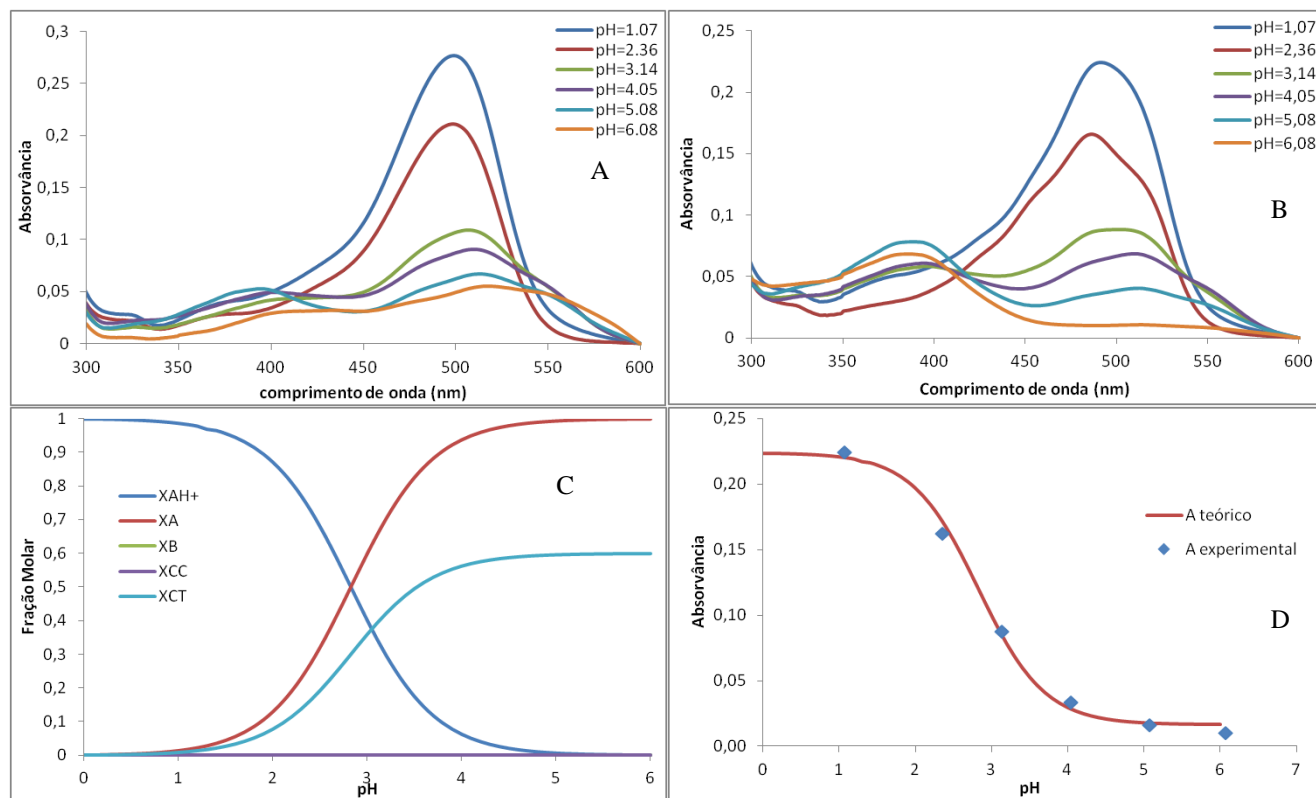


Figura A8: Comportamento da Luteolinidina em tampão acetato/metanol (10:90). (A) espectros de absorção a diferentes pHs, adquiridos imediatamente após preparação da solução ao pH desejado; (B) espectros de absorção das soluções medidas em A, adquiridos após 30 dias (equilíbrio termodinâmico) ; (C) gráfico da fração molar no equilíbrio em função do pH; (D) absorvância de AH<sup>+</sup> em função do pH (pontos azuis). A curva a vermelho foi ajustada de acordo com a equação 1.19. O ajuste foi possível através dos cálculos de  $K_a = 1,50E-03$  e  $K_h K_t K_i = 9,54E-06$ .

## 9. Bibliografia

- Bechtold, T. & Mussak, R., 2009. *Handbook of Natural Colorants*. s.l.:Wiley.
- Castañeda-Ovando, A. et al., 2009. *Chemical studies of anthocyanins: A review*, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas, Ciudad Universitaria, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, 42184 Mineral de la Reforma, Mexico: Elsevier.
- Creasy, L. L., 1982. *Cellular and Subcellular Localization in Plant Metabolism*, New York: Springer Science+Business.
- Ferreira, A. O., 2002. [Online]  
Available at: <http://www.ortofarma.com.br/site/Arquivos/6187/6187.pdf>  
[Acedido em 11 09 2015].
- Francis, F., 1989. *Food colorants: Anthocyanins, critical reviews food science nutrition*, s.l.: s.n.
- GARZÓN, G. A., 2008. [Online]  
Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n3/v13n3a2.pdf>  
[Acedido em 20 07 2015].
- Garzón, G. A., 2008. *LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN*, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia: s.n.
- Hagiwara, A., 2001. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5- b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. pp. 17-25.
- Hamerski, L., Rezende, M. & Silva, B., 2013. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: Substâncias naturais como corantes na indústrias Alimentícia. *Revista Virtual de Química*, Volume 5.
- Harborne, 1993. *Introduction to Ecological Biochemistry*. San Diego: s.n.
- HOF SOMMER, H. J., 1995. Determination of anthocyanins and carotinoids in fruit juices.. Volume 5, pp. 90-93.
- Hoshino, T., Matsumoto, U. & Goto, T., 1981. Phytochemistry. In: s.l.:s.n., pp. 1971-1976.
- Kapadia, G. J., 1997. Inhibition of 12 -O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. pp. 173-178.
- Kong, J. et al., 2003. *Analysis and biological activities of anthocyanins*, s.l.: s.n.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Morales, M. T. & Fett, R., 2006. *Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas*, Santa Maria - Brasil: s.n.

Lacasse, D., 1998. Introdução à Microbiologia Alimentar.. *Instituto Piaget, coleção ciência e técnica*, p. 578.

Março, P., Poppi, R. & Scarminio, I. S., 2008. Analytical procedures for identifying anthocyanins in natural extracts. *Química Nova*, Volume 31.

Markakis, P., 1982. Stability of anthocyanins in foods.. In: *Anthocyanins as food colors*. New York: s.n., pp. 163-180.

Melo, M., Moura, S., Maestri, M. & F, P., 2002. Micelle effects on multistate/multifuncional systems based on photochromic flavylium compounds. the case of luteolinidin. *Journal of molecular structure*, 22 10.pp. 245-253.

Melo, M. et al., 2000. "Write-lock-read-unlock-erase" with a natural compound. *journal of photochemistry and photobiology A*, Volume 135, pp. 33-39.

Moncada, M. et al., 2003. *Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylium salts A source for blue and purple color*, s.l.: s.n.

Nijveldt, R. et al., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*.

Ribeiro, P., 2012. *Processo de Liofilização de Produtos Alimentares*. [Online]  
Available at:  
<http://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/2138/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>  
[Acedido em 28 8 2015].

Roby, G., Harbertson, J., Adams, D. A. & Matthews, M., 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Issue Anthocyanins & tannins.

Salamon, I., Grulova, D. & Cioanca, O., 2015. *researchgate*. [Online]  
Available at: <http://www.researchgate.net/publication/276264654>  
[Acedido em 26 08 2015].

Youdim, K., Martin, A. & Joseph, J., 2000. *Incorporation of elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress..* s.l.:s.n.

Zhang, Y. et al., 2011. Investigation of the stability and antioxidant properties of anthocyanins-based purple potato colorants after processing. *African Journal of Biotechnology*, Volume 11, pp. 3379-3387.

